

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平7-504683

第3部門第2区分

(43)公表日 平成7年(1995)5月25日

(51)Int.Cl.⁸

識別記号

庁内整理番号

F I

A 6 1 K 39/39

9284-4 C

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 8 頁)

(21)出願番号	特願平6-503433	(71)出願人	シェリング・コーポレーション アメリカ合衆国ニュージャージー州07033, ケニルワース, ギャロップینگ・ヒル・ロ ード 2000
(86) (22)出願日	平成5年(1993)7月7日	(72)発明者	ボナム, エリック・エム アメリカ合衆国ニューハンプシャー州 03057, マウント・ヴァーノン, レミント ン・ロード 20
(85)翻訳文提出日	平成7年(1995)1月9日	(72)発明者	チャウドリー, イムティアズ, エイ アメリカ合衆国ニュージャージー州07006, ノース・コールドウェル, ローズ・アベニ ュー 18
(86)国際出願番号	PCT/US93/06298	(74)代理人	弁理士 湯浅 恭三 (外6名)
(87)国際公開番号	WO94/01133		
(87)国際公開日	平成6年(1994)1月20日		
(31)優先権主張番号	910,399		
(32)優先日	1992年7月8日		
(33)優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 GM-CSFのワクチンアジュバントとしての利用

(57)【要約】

本発明は、ワクチンと共に有効量のGM-CSFを哺乳類に投与することを含む、ワクチンに対する哺乳類の免疫反応を増強する方法である。本発明はさらに、有効量のGM-CSF、天然、合成または組み換え体抗原および薬学的に受容しうるキャリアーを含む医薬組成物を提供する。

1. ワクタンに対する哺乳類の免疫反応を増強する方法であって、ワクタン接種を必要とする哺乳類に対して、有効量のOE-CSFをワクタンと共に投与することを含む方法。
2. ワクタンがB型肝炎ワクチンおよびインフルエンザワクチンからなる群より選択される、請求項1記載の方法。
3. 投与されるOE-CSFが細胞製剤内に含まれる、請求項1記載の方法。
4. ワクタンに対する哺乳類の免疫反応を増強するためのOE-CSFの使用。
5. ワクタンに対する免疫反応を増強するための医薬品の製造のためのOE-CSFの使用。
6. ワクタンが、B型肝炎ワクチンおよびインフルエンザワクチンからなる群より選択される、請求項4または5に記載の使用。
7. OE-CSFが細胞製剤内に含まれる、請求項4または5に記載の使用。
8. 有効量のOE-CSFおよびワクタンを含む医薬組成物。
9. OE-CSFが細胞製剤内に含まれる、請求項8記載の医薬組成物。
10. ワクタン中の抗原に対する哺乳類の免疫反応を増強するためのキットであって、OE-CSFおよびそのための薬学的に受容するキャリアーの医薬組成物の容器、およびワクタンおよびそのための薬学的に受容するキャリアーの医薬組成物の容器を含むキット。
11. OE-CSFが細胞製剤内に含まれる、請求項10記載のキット。

性環境に適合したアジュバントは、アジュバントE5（ピーチワイルド、マンニトモノオレイン酸エステル (mannos monoleate)、モノステアリン酸アルミニウムを含む）、フロインド (freund's) 完全または不完全アジュバント；水酸化アルミニウム、油酸アルミニウム、および他の無機物質；ヘキサチルアミン、オクタデシルアミン、リステリン、ジメチルジオクタデシルアンモニウムブロミド、トリオクタデシル-N,N'-ビス（2-ヒドロキシメチル）-プロパンアミン、メトキシヘキサデシルグリセロールおよびポリノニカポリオール等の界面活性剤；ビタン、脂肪酸ステアリン、ポリビ、ポリアクリル酸およびポリボレン等のポリオレフィン；ムルミルリペプチド、ジメチルグリシンおよびタフタン等のペプチド；およびオイルエマルジョンを含むが、これらには限定されない。抗原または、ポリオームまたは他のマイコバクテリウムに取り込まれて投与することができる。

発明の要約

驚くべきことに、哺乳類コロニー刺激因子(OE-CSF)が効果的なワクタンアジュバントであることが発見された。

したがって、本発明は、ワクタン接種に必要な哺乳類に対して、有効量のOE-CSFをワクタンと共に投与することを含む、ワクタンに対する哺乳類の免疫反応を増強する方法を提供する。

好ましくは、規定される哺乳類はヒトであり、使用されるOE-CSFはヒトのA型β-2のサブタイプである。好ましくは、OE-CSFはワクタンの投与の1から14日前または1から14日後に、 10^6 から 10^8 個の細胞が投与される。

本発明はさらに、有効量のOE-CSF、天然、合成または組み換え体抗原および薬学的に受容するキャリアーを含む医薬組成物を提供する。

本発明はまた、その中に含まれるOE-CSFの医薬組成物を有する第一の容器、およびその中に含まれるワクタン医薬組成物を有する第二の容器を含む、ワクタン中の抗原に対する哺乳類の免疫反応を増強するためのキットを提供する。

発明の詳細な説明

本明細書に引用される参考文献の教示をすべて、本明細書の一部としてここに引用する。

発明の分野

本発明は、哺乳類コロニー刺激因子(OE-CSF)、特にヒトOE-CSFの、ワクタンアジュバントとしての利用に関する。

発明の背景

自然免疫とは、動物に免疫反応をもたらすためにその動物に抗原を投与することである。微生物に対するワクタンは、非免疫動物に接種された時に、その微生物に対する自然免疫を誘発するが接種を必要としない抗原接種である。特異性と記憶という二つの適応免疫システムの間には重要な区別がある。その適応免疫システムが抗原に対して二回目に遭遇したときに非常に強い反応を増強するため、ワクタン接種によって開始される。この二次性の免疫反応は、一次性の反応より早く出現しより効果的である。ワクタン接種の原理は、抗原性を失うことなく増強するように非生物もしくはその天然抗原を免疫化するものである。あるいは、抗原となる生物体抗原ペプチドを、遺伝子組み換えまたは合成化学によって生産し、有効なワクタンを産生することである。

自然免疫の過程においてしばしば遭遇する一つの問題は、ワクタンに使用される抗原が、強く細胞に対して初期を維持するために、または抗原に曝露してこのレベルを上げる能力を維持するために十分なレベルの抗体のタイターを生ずるのに十分な免疫性を有していないことである。もう一つの問題は、そのワクタンが、バクテリアおよびウイルス感染に対する一次性の免疫防御である細胞性免疫を誘発しないであろうということである。さらにもう一つの問題は、個々の患者は免疫抑制状態にあるかもしれないということである。

より強い免疫性および/または細胞性免疫を誘発するために、ワクタンをアジュバントを含む製剤中で投与することが一般的である。アジュバントとは、抗原に対する免疫反応を非特異的に増強する、もしくはアジュバントなしでは抗原に反応しない宿主を抗原に反応するようにさせる物質である。アジュバントは通常、抗原と共に投与されるが、抗原投与の直後に与えてよい。哺乳類のワク

本発明によれば、我々は驚くべきことに、ワクタンと共に有効量のOE-CSFを投与することにより、哺乳類、特にヒトのワクタンに対する免疫反応を効果的に増強しうることを発見した。本明細書において使用される「と共に」という用語は、OE-CSFをワクタンの投与と同時に、前もってまたは後に投与することを指す。

本明細書において使用される「OE-CSF」は、(a)Lea's (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82: 4318 (1985))に記載される成熟型（すなわちシグナル配列を欠く）ヒトOE-CSFの配列と實質的に同一なアミノ酸配列を有する、および、(b)天然型OE-CSFに共通の生物活性を有する蛋白質を意味する。

アミノ酸の實質的に同一性とは、配列が同一である、または生物活性を實質的に提供しない一つ以上のアミノ酸の置換（欠失、挿入、置換）によって異なっていることを意味する。ヒトOE-CSFの配列では、成熟型配列およびアミノ酸のヘテロジェニティが観察されている。たとえば、ヒトOE-CSFの配列に關して第100位のアミノ酸の位置で、スレオニンとイソソロニンとの両方が観察されている。また、Schriber's (Biochem. J. 247:195 (1987))は、第502位のメチオニン残基がイソソロニン残基によって置換されているとOE-CSFの配列を報告している。マウスおよびチナザル（わずかに3つのメチオニンを有する）およびラット等の動物のOE-CSFもまた本発明の要約するものである。哺乳動物の免疫システムで生産される組み換えOE-CSFまたは、当該技術分野においてよく知られるように、細胞の成熟メチオニン残基を有する。置換されている（すなわち、天然型抗原由来または異源生物免疫システム由来）、または置換されていない（すなわち、異源生物免疫システム由来または化学合成）のどちらであらうが、實質的に同一性の要求に適合するいかなるOE-CSFも含まれる。

本発明において使用されるOE-CSFは、天然型から得ることができる（米国特許No. 4,322, 432; Cassone, 同上; Burgess, 同上; Sperron, 同上; Fe, 同上）。天然に存在するOE-CSFと實質的に同一のアミノ酸配列および活性を有するOE-CSFを本発明において用いることができる。OE-CSFの配列（Cda）は、多くの研究員、例えはGough, Nature 303:763 (1985)（マウス）; Lea, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:4300 (1985)（ヒト）; Hong & Cassone, 228: 816 (1985)（ヒトおよびチナザル）; Cantrell, Proc. Natl. Acad. Sci.

酸アルミニウムをザルボン・ブチナフオイルに混合し、公知の方法にしたがってゲルを形成するために濃度を上昇させる。

ジオクチルナトリウムスルホスルホネートを注射水に溶解する。凍結乾燥したG-CSFを、ジオクチルナトリウムスルホスルホネート溶液で再懸濁し、得られる溶液をエマルジョン用ブチナフオイル中に降してボルテックスにより混合する。得られるエマルジョンを凍結乾燥したザルボン・ブチナフオイル中に浸して、ボルテックスにより混合する。

製剤

成分

凍結乾燥G-CSF	10-1000mcg
酢酸ナトリウム	0.2mg
凍結二ナトリウム	2.27mg
凍結一ナトリウム	0.55mg
水酸化ナトリウム	0.5mg
注射水 (充分量)	[ml]

製剤にしたがってG-CSFの凍結乾燥物を製造するためには、凍結一ナトリウムおよび凍結二ナトリウムを一部の注射水に溶解する。次に凍結乾燥G-CSFをこの溶液に溶解し、水酸化ナトリウムによりpHを7.0に調整する。次に酢酸ナトリウムを加え、pHを調整する。残りの注射水でこの溶液を最終体積に合わせる。好ましくは、水酸化ナトリウムおよび凍結乾燥物の高い水溶液 (例えば、凍結乾燥物250mg/mlの水溶液を100μl) として加える。

別の凍結製剤

G-CSFの別の凍結製剤は、ポリアンヒドリド、ポリネオファン、コラーゲン、アルギネート、ポリ (イタリレート)、ゼラチン、ポリ (ヒドロキシプロパレート)、ポリ (カポラタン)、エチレンジニルセオレートまたはポリラクトグリコド等のポリマーを使用して調整したG-CSFの微小カプセルまたはマイクロスフェアを使って調整することができる。

G-CSFの別の凍結製剤はまた、ポリエチレングリコール、デキストランポリ (アミノ酸) および他の同様なポリマーを使用してG-CSFの化学コンジュゲートとして

調整することができる。

ワクチンの免疫反応を増強するG-CSFの効果は、以下の非制限的且つ非排他的データによって例証されるが、本発明の範囲を限定するものと解釈してはならない。

実験例1

組み換え体ヒトG-CSFは、2型肝炎ワクチンに反応しなかった通肝患者の組み換え体2型肝炎ワクチンの効果を増強することが示された。

本実験の目的は、G-CSFと2型肝炎ワクチンの同時投与が、2型肝炎ワクチン接種に反応しなかった患者を待つ患者に対する免疫反応を促進しうかどうかを決定することであった。

少なくとも3回の2型肝炎ワクチンの接種の試みにおいて、2型肝炎ウイルス抗原 (HBsAg) に対する抗体タイターから判断して反応しなかった15人の通肝患者をG-CSFで処理した。6人の患者は、患者の体重量あたり0.5μgのG-CSF (Scherer-Plough, Kenilworth, New Jersey, USA) によって大腸菌発現システムで生産されたものを皮下に投与され、5人の患者は、患者の体重量あたり5μgのG-CSFを投与され、4人の患者は、患者の体重量あたり10μgのG-CSFを投与され、そして投与部位に印をつけた。G-CSFの投与後2週間において、患者はそれぞれ、G-CSFを投与された場所と同じところに40μgの2型肝炎ワクチン、BBVex (登録商標) (Berch, Sharp and Bohm, Gmbh, Darmstadt, Federal Republic of Germany) を投与された。ワクチン投与後の2週間後、患者から血液サンプルを採取し、サンプルを抗2型肝炎抗体の存在について調べた。結果は以下の表に示す。

G-CSFの用量 (μg/kg wt.)	HBsAgに対する抗体タイター *単位/Liter
0.5	0
0.5	0
0.5	0
0.5	0
0.5	0

示されている。

したがって、インフルエンザワクチンへの免疫反応が組み換えG-CSFの投与によって増強されるかどうかを決定するために、二重盲検プラシーボを対照とした用量上昇試験が行われた。組み換え体G-CSF (Scherer-Plough, Kenilworth, New Jersey, USA) によって大腸菌発現システムで生産されたもの) の5つの異なる用量、すなわち0.25、0.5、1、2.5、5μg/kgを、プラシーボとの比較において試験した。60人の健康な受試者群が対象となった。対象者は、フランス1992-1993の冬期が感染されたインフルエンザワクチン (インフルボール®/46[191]、A/北京/353/92[32]およびB/山形/16/93) (Pasteur Vaccines, Barmes-la-Croixette, France) を片方の腕に筋肉内投与される直前に、組み換え体G-CSFまたはプラシーボを他方の腕に皮下投与された。両腕とも血液検査結果 (HAI) 抗体の3つのインフルエンザウイルス株に対するタイターを、ワクチン投与前、ワクチン投与後1、3および6週間において決定した。インフルエンザワクチンと共にプラシーボが投与された15人の患者の内、0人も、3つ全ての株のインフルエンザワクチンに対する両側血液検査を所与なかったが、2.5および5μg/kgの組み換え体G-CSFを投与された5人の患者の内、5人 (50%) および3人 (32%) が3つ全ての株に対して血液反応した。

使用されたプロトコールを、以下により詳細に記述する。

材料および方法

患者の選択 患者は健康な成人で両腕を余り、少なくとも65才であった。ボランティアは、両腕および、完全な血液細胞数計測、生化学、尿検査および血液検査を含む検査結果により完全な健康状態であった。対象者は、A/31[1]およびインフルエンザで1:40以上の血液検査結果 (HAI) 抗体のタイターを、およびフランス1992-1993インフルエンザワクチンに含まれる46-93[2]インフルエンザ株で1:80以上のタイターを持っていなければならない。悪いいかまたは不安定な病歴の患者または既存の腫瘍を持つ対象者、抗腫瘍または免疫抑制薬を服用している対象者、試験検査値による著明な重大な病変を示した対象者、前記対象者のアレルギーを持つ対象者、過去6ヶ月間にインフルエンザ後の病歴がある対象者、または試験期間に急性の病変であった対象者は、血液から除外された。

0.5	710
5.0	0
5.0	35
5.0	125
5.0	920
5.0	2680
10.0	0
10.0	0
10.0	440
10.0	7240

* [単位は、標準ELISAで最大反応の半分の反応を示す血清濃度の逆数として定義される。

上に示されたデータに見られるように、G-CSFは、2型肝炎ワクチンと共に使用される効果的なアドユバントであった。

実験例2

組み換え体ヒトG-CSFは、高齢者におけるインフルエンザウイルスワクチンの効果を増強することが示された。

抗流行性 (インフルエンザ) および流行性 (インフルエンザとB) の間に生ずるヒトインフルエンザウイルスは、健康状態を弱めている高齢者のみならず、明らかに健康な高齢者においても重大な健康な喪失を引き起こす。インフルエンザワクチンは、健康中に死亡の危険性を減少させる意思を提示することが示されている。インフルエンザワクチンは、インフルエンザ感染の合併症を生ずる危険性を1人に多くに多く低減されており、危険性が低い場合にワクチン接種を行う努力に毎年多大な利益が望まれている。

しかしながら、大腸菌発現システムにも関わらず、インフルエンザは高齢者において頻度と致死率の両方ともとして知られている。2から3回の接種ワクチン投与または最初の投与後1ヶ月でのブースター投与等のいくつかの方法は、高齢者のインフルエンザワクチンに対する免疫反応を改善することはないことが

フロントページの続き

(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M C, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AU, BB, BG, BR, BY, CA, CZ, FI, HU, JP, KR, KZ, LK, MG, M N, MW, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SK, UA, US, VN

(72) 発明者 スタバク, エリオット
アメリカ合衆国ニュージャージー州07006,
ウエスト・コールドウェル, ウッドラン
ド・ロード 11